

Metastabil állapotok feltérképezése a fehérjék nyomás-hőmérséklet fázisdiagramján

A 49216 sz. OTKA pályázat részletes zárójelentése

Vezető kutató: Smeller László

Munkánk fő célkitűzése a fehérjék fázisdiagramjának vizsgálata, a fázisdiagram metastabil régióinak felderítése, valamint a metastabil tartományok kinetikai jellemzése volt.

Az első évben a munkaterv szerint a kiszemelt fehérjék nyomás-hőmérséklet fázisdiagramjainak főbb pontjait kellett meghatározni valamint ezen átalakulások termodinamikai paramétereit kellett kiszámolni.

A munkatervnek megfelelően meghatároztuk a tojásfehérje-lizozim, a mioglobint, apomioglobint, tormaperoxidáz és az alfa krisztallin denaturációs nyomás- és hőmérséklet-adatait. A mérések egyrészt fluoreszcens (lizozim és apomioglobin) abszorpciós (mioglobin) spektroszkópiai mérésekkel végeztük. Nemzetközi együttműködés keretében végzett Fourier transzformációs infravörös mérésekkel is kiegészítettük a méréseinket (tormaperoxidáz, lizozim, mioglobin, alfa-krisztallin). Ezeknek a méréseknek az volt a célja, hogy segítségükkel kiválasszuk azt a fehérjét, amelynek a fázisdiagramját részletesebben is vizsgálni fogjuk.

Az eddigi vizsgálatok alapján a részletes mérésekre a lizozimot szemeltük ki. A lizozim mellett szól, hogy ezt sikerült a legtöbb rendelkezésre álló technikával mérni, azaz a molekulaszervezet a triptofán fluoreszcencia és az infravörös mérésekkel is detektálható. Az előzetes méréseink azt is bebizonyították, hogy a lizozim nyomásdenaturációja után az aggregációra való hajlam megnő, ami azt mutatja, hogy a fázisdiagram egyértelműen tartalmaz metastabil régiókat.

A mioglobin esetében a fázisdiagram egy új jellegzetességét is felfedeztük, nevezetesen, hogy az aggregált fázis magas hőmérsékleten szétbomlik.

A nagy nyomású fluoreszcens spektroszkópiai mérések elvégzéséhez fejlesztést végeztünk, aminek következtében a vizsgálható nyomástartományt a triptofán fluoreszcencia mérések esetén egészen 1,5 GPa-ig kiterjesztettük a gyémánt cella alkalmazásával.

Az eredmények egy részét Montpellierben a Nemzetközi Biofizikai Kongresszuson (egy poster), valamint a hozzá kapcsolódó Trends in High Pressure Protein Science konferencián (egy előadás) mutattuk be.

A kutatási eredményekből az első évben egy referált folyóiratban megjelent cikk készült el (a mioglobinra vonatkozó eredményekből) [1].

A második évben a kutatás munkaterv szerint az volt a cél, hogy a kiválasztott fehérje nyomás-hőmérséklet fázisdiagramját pontosan megmérjük, meghatározzuk az átalakulási paramétereket és megkeressük azokat a metastabil tartományokat, amelyek a további kinetikus vizsgálatok számára alkalmasak lesznek.

Ennek megfelelően megmértük a tojásfehérje lizozim nyomásdenaturációs pontjait különböző hőmérsékleteken. A kapott fázisátalakulási pontokat a kétállapotú rendszer modellel értelmezve számoltuk a fázisátalakulás termodinamikai paramétereit. A denaturációs fázisátalakulási pontokra illesztettük a fehérjék elliptikus diagramját, ami a metastabil fázisok keresésének kiinduló pontja. Megállapítottuk, hogy a fehérje nyomásdenaturációs-renaturációs ciklusa utáni szerkezetek már 20°C fokon is metastabilak, szemben a mioglobinnal, ahol ehhez magasabb, de még mindig szubdenaturációs hőmérséklet volt szükséges.

A kutatás fő fehérjéjének kiválasztott lizozim monomer egy doménből álló fehérje. Ezért összehasonlításként tanulmányoztuk a tetramer hemoglobin denaturációját ill. disszociációját, valamint a két doménből álló foszfoglicerát kináz ill. a három doménes humán szérumalbumin fehérje széttekeredését is. A foszfoglicerát kináz esetén a ki- és visszatekeredés kinetikáját is mértük, amely szokatlanul lassúnak adódott, valószínűleg a két domén kölcsönhatása miatt. A szérumalbumin esetén újdonságnak számít, hogy a fehérjék többségével ellentétben a nyomásdenaturáció után újrateremtett szerkezet nem hajlamos aggregációra, hanem ellenkezőleg, még a natívnál is stabilabbnak tűnik.

Méréseinket lumineszcencia és infravörös spektroszkópai módszerekkel végeztük.

Mivel Böde Csaba, akinek a díjazására eredetileg az 1,2 sor alatti összeget szántuk, tanársegédi állást kapott az intézetünkben, lehetőség nyílt arra, hogy a felszabaduló keret terhére Szigeti Krisztiánt (fizikus doktorandusz) alkalmazzuk, ahogy az OTKA iroda vezetője is javasolta KO-24634/2005 sz. levelében.

Ezt a többlet erőforrás bevonás sajnos kompenzálta, hogy a labor váratlan költözése mintegy három hónapig gátolta a kísérleti munkát. Összességében azonban a második év végére az elért eredmények kitűzött célokkal összhangban voltak.

Eredményeinkről a prágai XLIV EHPRG (European High Pressure Research Group) konferencián számoltunk be, ahol a közeli helyszín miatt lehetőség nyílt arra, hogy a munkában résztvevő összes kutató részt vegyen és prezentálja eredményeit (1 orális előadás+3 poster).

A kutatás második évében három, a kutatással összefüggő referált cikket publikáltunk [2-4]. Ezek közül az egyik [4] csak részben kötődik a jelen pályázathoz, amennyiben múlt évben a jelen pályázat keretében a hemoglobinon végzett stabilitás és nyomásdenaturációs mérések itt kerültek publikálásra, egyéb nem a pályázat keretében végzett mérésekkel együtt.

A harmadik évben metastabil fehérjeszerkezetek kialakulásának és refoldingjának ill. aggregációjának kinetikai jellemzése volt a feladatunk. A lizozim fázisdiagramjának metastabil tartományában végeztünk kinetikai méréseket. Ezeket a méréseket megkönnyítette, hogy 2006 decemberében egy modern Fourier transzformációs infravörös spektrométer érkezett a laboratóriumba (nem OTKA forrásból), amely a témavezető gondozásába került, és így az FTIR mérések már helyben végrehajthatók voltak.

A lizozim nyomásdenaturációja utáni visszatekeredés során mértük a másodlagos szerkezet újraalakulásának és a közben formálódó aggregátumok megjelenésének

kinetikáját, különböző hőmérsékleteken és nyomásokon. Megállapítottuk, hogy ezek a folyamatok nem írhatók le egyszerű kétállapotú rendszert feltételezve. A kinetikák csak kettős (lecsengő) exponenciális függvényekkel voltak illeszthetők. A jelenség magyarázatára egy több kompartmentes modellt dolgoztunk ki, amelyik leírja az aggregáció többlépcsős jellegét. Feltételezéseink szerint a kezdetben viszonylag gyorsan (kb 1 óra karakterisztikus idővel) kialakuló amorf aggregátumok egy lassú átrendeződésen mennek át, melynek karakterisztikus ideje egy nagyságrenddel nagyobb, mint az amorf állapot kialakulásáé. A kinetikai állandók nyomásfüggéséből megállapítottuk az amorf állapot kialakulásához szükséges aktivációs térfogatot, a hőmérsékletfüggéséből pedig az aktivációs energiát.

Ugyancsak mértük a szubdenaturációs nyomásokon már kialakuló dezaggregáció kinetikai paramétereit.

Az aggregációkinetikai vizsgálatokat olyan, az enzimfunkció kinetikájára vonatkozó kísérletekkel egészítettük ki, ahol a nyomás alkalmazásával szintén értékes aktivációs paramétereket nyerhettünk. Erre a POR enzim bizonyult alkalmasnak, ahol az enzimfunkció kinetikájának nyomás és hőmérsékletfüggésének méréséből a folyamat aktivációs térfogatát határoztuk meg [5].

Az eredményeket a XLV EHPRG – XXI AIRAPT konferencián Cataniában, valamint a balatonfüredi Regionális Biofizikai konferencián egy-egy előadás, illetve a XII ECSBM konferencián (Párizs) egy poszter formájában publikáltuk. Ezen kívül még egy cikk jelent meg referált folyóiratban az eredményeinkből a 2007-es év során, valamint egy másik közlésre elfogadott cikk fog hamarosan megjelenni.

Összegezve: a lizozim, a mioglobin, az alfa-krisztallin, a foszfoglicerát-kináz és a humán szérumalbumin fehérjék fázisdiagramján találtunk metastabil fázisokat. Ezek közül a lizozim metastabil tartományát részletesen is jellemeztük kinetikai mérésekkel.

Eredményeinket eddig 6 cikkben publikáltuk. Ezeken kívül még két cikk van előkészületben a felsorolt kinetikai eredményekből. Ezeket később szeretném az OTKA elektronikus rendszerén keresztül csatolni a pályázat zárójelentéséhez (remélhetőleg még 2008-ban).

A kutatómunka összességében a terveknek megfelelően elérte a kitűzött célt, egy kiválasztott fehérje metastabil fázisainak jellemzését. Természetesen, mint minden kutatás ez is vetett fel újabb kérdéseket, amelyek megválaszolására még további kísérletek szükségesek, remélhetőleg ezek is elvégezhetők lesznek egy későbbi pályázat keretében.

Hivatkozások:

1. Meersman, F., Smeller, L., Heremans, K (2005)
Extending the pressure-temperature state diagram of myoglobin *Helvetica Chimica Acta* 88, 546-556.
2. Meersman, F., Smeller, L., Heremans, K (2006)
Protein stability and dynamics in the pressure-temperature plane *Biochimica et Biophysica Acta –Proteins and Proteomics* 1764, 346-354.

3. Smeller, L., Meersman, F., Heremans, K (2006)
Refolding studies using pressure. The energy landscape of lysozyme in the pressure-temperature plane *Biochimica et Biophysica Acta Proteins and Proteomics* 1764, 497-505.
4. Schay, G., Smeller, L., Tsuneshige, A., Yonetani, T., Fidy, J (2006)
Allosteric effectors influence the tetramer stability of both R-and T states of hemoglobin A *Journal of Biological Chemistry* 281, 25972-25983.
5. Solymosi, K., Smeller, L., Ryberg, M., Sundqvist, C., Fidy, J., Boddi, B (2007)
Molecular rearrangement in POR macrodomains as a reason for the blue shift of chlorophyllide fluorescence observed after phototransformation *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes* 1768, 1650-1658.
6. Smeller L; Meersman F; Heremans K. (2008) Stable misfolded states of human serum albumin revealed by high-pressure infrared spectroscopic studies, *Eur Biophys J* (közlésre elfgadva) DOI 10.1007/s00249-008-0277-0